

**Espacenet**JP
Citation 1**Bibliographic data: WO 03013588 (A1)****KIDNEY REGENERATION MATERIAL COMPRISING CELLS AND CELL GROWTH FACTOR**

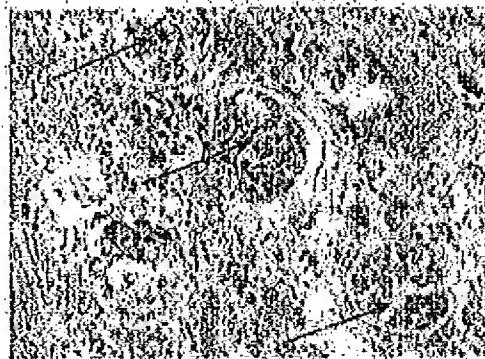
Publication date: 2003-02-20
Inventor(s): TABATA YASUHIKO [JP]; OGAWA OSAMU [JP] ±
Applicant(s): TABATA YASUHIKO [JP]; OGAWA OSAMU [JP]; KAKEN PHARMA CO LTD [JP] ±
Classification:
- International: A61L27/38; A61P13/12; A61P43/00; C12N5/0775; A61K35/12;
(IPC1-7): A61K35/12; A61K38/22; A61L27/00; A61L27/22;
- European: A61P13/12; A61P43/00
Application number: WO2002JP07995 20020806
Priority number(s): JP20010240491 20010808
Also published as: [JP 4358621 \(B2\)](#) ←
Cited documents: [WO9911664 \(A1\)](#) [WO9809582 \(A1\)](#) [JP6198763 \(A\)](#) [View all](#)

Abstract of WO 03013588 (A1)

A material for the regeneration of kidney in vivo which comprises undifferentiated mesenchymal stem cells and a cell growth factor; and a method for kidney regeneration.

A

Last updated:
04.04.2011 Worldwide
Database 5.7.20; 92p

B

*** NOTICES ***

JPO and INPI are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

(57)[Claim(s)]

[Claim 1]

Material for reproduction of the kidney accompanied by a rebirth of an in vivo glomerulus
organization in which an undifferentiated mesenchymal stem cell and water content contain
bFGF gradual-release-ized by bridge construction gelatin which is 95%, and collagen, and a
rebirth of a renal tubule.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**Technical field**

This invention relates to the material for reproduction by in vivo one of the kidney using combining an undifferentiated mesenchymal stem cell and a cell growth factor.

Background art

There is a big fault that it is temporary in an effect, its invasion is large, and its function which can be assisted is single although reconstruction Medical Science Division using an artificial organ contributes to clinical greatly now. On the other hand, an infectious disease, oncogenesis, etc. by side effects of an immunosuppressant after transplantation are a problem insufficient [a donor], and transplantation Medical Science Division is also hard to be called ideal therapy. Thus, two main posts of the present advanced medicine are reaching a limit at each. In such a situation, the trial of a new therapy in which the organization and organ which suffered a loss or went to ruin are restored is performed by reproducing a self organization. This is regenerative medicine. That is, it is a trial in which self organization and organ will be artificially made again healthy, by using a cell.

In mammalian including *Homo sapiens*, it has been thought that the ability to regenerate of the organ which specialized high order has disappeared. However, these animals are also considered to have the ability to regenerate in recent years. That is, in mammalian, as a result of the wound healing for protecting an individual advancing early too much, the place of organ reproduction is taken and the ability to regenerate which it originally has is missed. For example, a bone marrow transplantation is a cure performed for many years, and is obtaining good clinical results. This is considered to have succeeded just because the place of **** which can carry out growth differentiation of the blood stem cell in marrow cells, and the myeloid tissue exist in the inside of the body. That is, also although it is called *Homo sapiens*, in order for the individual to survive, it cannot survive, if a stem cell does not exist in an organization and an organ, and self-organization may be able to be reproduced if the place of sufficient reproduction can be given to the stem cell which probably exists widely in the living body. It turns out that a stem cell exists in a nervous system, liver, etc. in recent years.

Then, although research and development in the method of various anagenesis is done by the basis of such an idea, the scaffold for reproduction, a cell growth factor, and the method of using combining three persons of a stem cell are the most realistic at present.

For promotion of adhesion, differentiation, and morphogenesis of the stem cell in a reproduction place, or a precursor cell, the scaffold for reproduction is required. Although the body tissue of a reproduction place can serve as a reproductive scaffold, a scaffold matrix may be needed as a scaffold for reproduction. The living body absorbent material is used as this matrix.

However, however there are few stem cells required for reproduction, precursor cells, or blast cells, or the matrix may be excellent for example, if the concentration of the living body factor which does growth differentiation of the cell is too low although a scaffold matrix is embedded at a reproduction place, the rebirth of an organization to desire will not take place. Then, the cell growth factor for growth of a cell or differentiation is first thought as what should be filled up. Generally, the life of these factors in the living body is short unstable, and the anagenesis effect

to expect is not acquired only by only melting a required cell growth factor in water, and pouring it into a required part. Then, the concentration of the cell growth factor in a reproductive place must be maintained at effective value over a required period. For example, it is the technology which includes a cell growth factor in a gradual release carrier and to which it is made to emit continuously at a reproductive place. Growth differentiation of a cell increases and it is urged to the rebirth of self-organization by gradual release of a cell growth factor. However, just the cell growth factor of reproduction is insufficient often depending on the kind of an organization or organ.

The kidney is a hemofiltration organ.

The end product of the metabolism of the body is excreted in a urinary form, and hydrogen in extracellular fluid, sodium, potassium, a phosphorus, and other ion concentration are adjusted. By balance of elimination and a resorption mechanism, it has functions, such as regulation of moisture, an electrolyte, body fluid osmotic pressure, and an acid base equilibrium. If the function of the kidney becomes insufficient, blood pressure will rise, nitrogenous metabolite, such as urea and creatine, will store into blood, and the blood drug concentration of living body waste will increase even to harmful concentration. In order to cancel such pathology, the treatment which replaces the function of the insufficient kidney is needed.

Hemodialysis is treatment which cleans and filters the blood in kidney-function failure conditions. The concentration of hazardous wastes etc. decreases by the treatment concerned. However, there is a problem that this treatment has side effects and the danger of complication in this top 3 times and once per week for 2 to as long as 4 hours.

The renal transplantation is treatment which plants the healthy kidney from a donor in the individual troubled with renal failure. However, administration of the immunosuppressant over a lifetime is needed and side effects produced as a result, such as infectiosity and canceration, pose a problem. There is also a problem that there is no donor of sufficient quantity for all the individuals which need transplantation.

Not transplantation of kidney itself but transplantation of a kidney cell is reported (Pediatrics, 1996, 98S, 615). According to it, the kidney cell of C57 black mouse was cultured, and after enclosing with the tube made from polycarbonate, when transplanted to the hypodermic of an athymic mouse, in observation to the backward one, the vascularization, a glomerulus, and renal tubule Mr. structure were accepted for eight weeks. The alkaline phosphatase and fibronectin were observed in the renal tubule Mr. structural site, and uric acid was detected from the secreted yellow liquid.

According to another report, the kidney cell of New Zealand White Rabbit A distal tubule, Formation of the nephron was accepted, when fractionation was carried out to the glomerulus and the proximal tubule, and each was cultivated on the polylactic acid-polyglycolic acid sheet and having been transplanted to the hypodermic of an athymic mouse (J. Urol, 1995, 153 (suppl.), 4).

WO98/09582 indicate the artificial kidney adapting the above-mentioned technology. However, this artificial kidney extracts a hybrid type artificial kidney, i.e., the kidney, and after it cultures that cell, it reconstructs it to the organ. Such a differentiated cell has a limitation in the life, and since the function maintenance as a kidney cell is difficult, there is a problem in the endurance and the reliability of an artificial kidney. When using the cell [like] of non-self from heterozoic, the problem of immunological rejection always hangs around.

Unquestionable [in order to reproduce an organization organ by In vivo one / that the cell which constitutes the organization or organ is required]. However, it is very difficult to make the place reproduce an organization and an organ only by pouring into the part which only wants to reproduce a cell. This is because that the added cell increases and specializes by the part can hardly expect. In order to promote growth and differentiation of a cell positively in the living body, existence of a cell growth factor is indispensable. It is already proved that an undifferentiated mesenchymal stem cell, a precursor cell, or a blast cell increases the number, and specializes under existence of a suitable cell growth factor by many in vitro experiments. However, the environment of the cell completely differs and it is difficult to reproduce and predict an in vitro result in in vivo ones in vitro one and in vivo one in many cases.

In order to solve the above-mentioned problem about growth differentiation of the cell in vivo one, as a result of inquiring wholeheartedly, by using combining an undifferentiated mesenchymal stem cell and a cell growth factor, this invention persons found out that reproduction of the kidney in vivo one became very advantageous, and completed this invention.

The indication of invention

Therefore, this invention supplies the material for reproducing the kidney by in vivo one by using combining an undifferentiated mesenchymal stem cell and a cell growth factor.

This invention relates also to the reproducing method of the kidney including using the above-mentioned material.

The best form for inventing

Hereafter, technical constitution of this invention is explained.

The cell used by this invention is an undifferentiated mesenchymal stem cell. This cell can increase a number for extracting from an animal and Homo sapiens, or its extraction cell in a culture system.

Mixing with the undifferentiated mesenchymal stem cell used for this invention and its cell growth factor and a rebirth of the kidney organization using those system engineering materials can be performed by the following methods.

Although it is also possible to add some embellishing point to the cell isolating method, there is no place which they contribute to the differentiation character of a cell greatly. The method of extracting an undifferentiated mesenchymal stem cell can be performed with a conventional method. For example, bone marrow fluid is extracted from bone marrow, such as a femur and a tibia, a cell is distributed by pipetting etc., this is suspended to a suitable culture medium or saline, such as alpha-MEM, and marrow cell suspension is prepared. This cell is cultured for example, for seven to ten days with an incubator under the condition of 37 ** and 5% carbon dioxide, after that, for example, it exfoliates using trypsin 0.05%, and adhesion cells are collected. The obtained undifferentiated mesenchymal stem cell can be cultured with an incubator under the condition of 37 ** and 5% carbon dioxide, and growth and a passage can also carry out a cell. Culture medium is made to distribute this cell and the cell growth factor of concentration suitable in it is mixed. The obtained complex is embedded against the kidney deficit of SD rat, for example. A rebirth of a kidney organization is seen to an embedding part in 36 weeks.

If the cell to extract is an undifferentiated mesenchymal stem cell, regardless of the kind of animal to extract, age, and its part, any organization can use it for this invention. Generally, immunological rejection is a vital reaction to a cell component. There is a method of using the undifferentiated mesenchymal stem cell extracted from the self organization as a method of avoiding this immunological rejection, for example. According to this, it is thought that the problem of immunoreaction is solvable. That is, in this invention, the kidney organization of self is also renewable by using a self cell component.

Especially as a cell growth factor used for this invention, although not limited, a thing with the operation which makes the number of undifferentiated mesenchymal stem cells increase is preferred. For example, a basic fibroblast growth factor (bFGF), a platelet derived growth factor (PDGF), An insulin, an insulin like growth factor (IGF), a hepatocyte growth factor (HGF), a glial derivation neurotrophic factor (GDNF), a neurotrophic factor (NF), hormone, cytokine, an osteoplastic factor (BMP), a transforming growth factor (TGF), etc. are mentioned. In especially this invention, bFGF is [among these] desirable, the concentration -- cell number 10^5 -- 0.0001-10 microper 10^8 individual g -- it is 0.001-1 microg preferably.

In the state where the desirable suitable carrier for gradual release was made to contain, it mixes with a cell and these cell growth factors used for this invention are used. When using it in the state where the suitable carrier for gradual release was made to contain, the release period has a good range for about one to three weeks.

What has the character by which decomposition absorption is carried out in the living body as a carrier for gradual release of a cell growth factor is preferred. For example, the copolymer of polylactic acid, polyglycolic acid, lactic acid, and glucohol acid, A copolymer with a Polly epsilon-caprolactone, epsilon-caprolactone, lactic acid, or glycolic acid, Polycitrate, polymalic acid, Polly

alpha-cyanoacrylate, poly-beta-hydroxybutyric acid, A poly trimethylene oxalate, a polytetramethylene oxalate, Poly orthoester, poly orthocarbonate, polyethylene carbonate, Polypropylene carbonate, a Polly gamma-benzyl-L-glutamate, Synthetic macromolecules, such as a Polly gamma-methyl-L-glutamate and Polly L-alanine, Protein, such as polysaccharides, such as starch, alginic acid, hyaluronic acid, a kitchen, pectic acid, and its derivative, or gelatin, collagen (any may be sufficient as the type of collagen and its extraction method), albumin, and fibrin, etc. are mentioned. Although the carrier for gradual release of a cell growth factor is producible from such materials, and there are the shape of a disk, film state, rod-like particle state, paste state, etc. as the form, it is not limited to these. For example, when aiming at uniform mixing with basement membrane components in it, the carrier of particle state is preferred. 10-500 micrometers of diameters of particles are 20-100 micrometers preferably. Sustained-release regulation can be performed by adjusting the resolvability of the carrier for gradual release. Regulation of resolvability can be performed by changing the degree of cross linking at the time of carrier production, for example. What is necessary is to adjust the cross linking agent concentration or reaction time at the time of carrier production, to make water content into 98 to 94% for example, and just to produce the carrier for gradual release by which decomposition absorption is carried out in one to three weeks, in order to make a release period into one to three weeks.

Although the manufacturing conditions in particular of the system engineering material which consists of a cell and a cell growth factor are not limited, it is also good to mix both or it may mix them with liquids, such as buffer solution, a physiological saline, a solvent for injection, or a collagen solution, for example. 100,000-5 million pieces are desirable as the number of cells to be used. It can also use, where the mixture of a cell and a cell growth factor is mixed with pourings or those scaffolds into scaffolds, such as sponge which consists of a living body absorbent material, a mesh, and a non-woven fabric-like molded product.

In this case, since it is thought indispensable that it is living body absorptivity as a scaffold to be used and a rebirth of an organization is interfered physically in an unabsorbent case, it is not desirable. A suitable thing needs to be chosen and used for the decomposition absorptivity of a scaffold so that it may not become the obstacle of a rebirth of an organization. When a scaffold is synthetic macromolecule, those absorptivity can be controlled according to the grade of the bridge construction to the case of naturally-occurring polymers by the molecular weight and chemical composition. A publicly known method can be used about these methods.

Having the character by which decomposition absorption is carried out in the living body as a scaffold used for pouring of a cell and a cell growth factor and mixing which are used in this invention can use the material used for the carrier for gradual release of a desirable above-mentioned cell growth factor indispensable. A scaffold and a sustained-release carrier may use the same material, and may use different things. As the form, although there are the shape of a disk, film state, rod-like particle state, paste state, etc., it is not limited to these.

The mixture of the cell of this invention and a cell growth factor or the mixed composite with the scaffold can be thrown into the inside of the body by cutting the skin open and pouring in by embedding or injection.

EXAMPLE

Although working example is given and this invention is explained hereafter, this invention is not limited to the following working example.

Working example 1 Preparation of a scaffold

After heat-treating [of 2 hours] at 140 **, and performing chemistry bridge construction in 0.2wt% of glutaraldehyde solution, the aldehyde group unreacted in glycine solution was blocked. It washed in cold water after that and the obtained collagen sponge was pierced by freeze-drying to the cylindrical shape (about 5 mm in diameter, and 3 mm in thickness). Collagen sponge was rolled in the mesh of the pore size 200micrometer polypropylene which sterilized, and in order to maintain the form, a mesh was further fixed with 7.0 nylon yarn. This was embedded to the cylindrical lacking part produced into the kidney. It is for making it clear whether the Reason for having put in a mesh is an organization of that which isolated the embedding collagen sponge part and the kidney organization part in the in-house and to which neoformation was newly born

to the lacking part, and kidney organization origin.

Working example 2 Isolation and refining of an undifferentiated mesenchymal stem cell
The 6-week old female femur and tibia of SD rat (Shimizu Co., Ltd. laboratory animal) are extracted, extracting bone marrow by clean operation -- initial culture-medium (alphaMEM, GIBCO BRL) 10.2wt% and sodium bicarbonate (Nacalai Tesque) 26.2mM and penicillin (500 U/l)-streptomycin (500microg/l) -- it cultivated by the mixture (SIGMA) and 15% of the calf blood serum. 0.05% trypsin / EDTA solution recovered the pasted-up cell seven to ten days afterward, and the passage was carried out using the same culture medium.

Working example 3 Preparation of gelatin particles

The propeller for product churning made from Teflon was attached to the motor for churning (new east science company make, three one motor) which added 375 ml of olive oil to the round bottom flask of 1000-ml **, and was fixed, and it fixed to it together with the flask. The solution (10wt%, 10 ml) of alkali treatment gelatin (made by Nitta Gelatin, Inc.) of the isoelectric point 4.9 was dropped agitating olive oil at 30 ** and 420 rpm, and W/O emulsion was prepared. After churning for 10 minutes, it cooled at 10-20 **, and the flask was further agitated for 30 minutes. After adding 100 ml of acetone to the emulsion and agitating for further 1 hour, centrifugal separation (for 5000 rpm, 4 **, and 5 minutes) recovered gelatin particles. The gelatin particles unconstructed a bridge were obtained by using 2-propanol for an acetone pan and carrying out centrifugal washing of the particles. The solution (100 ml) of 0.1wt%Tween80 containing glutaraldehyde of 0.01wt% concentration was made to suspend the obtained unconstructed bridge gelatin particles (500 mg), and 4 ** of crosslinking reaction of gelatin was performed by agitating gently for 15 hours. Then, after the solution of 0.1wt%Tween80, 2-propanol, and distilled water washed particles 2 times respectively, it freeze-dried. The diameter of the particles at the time of the equilibrium swelling in 37 ** among the time of the air dried from 2-propanol, or PBS, When water content was computed as a ratio of the volume of the water which measures under a microscope about 100-piece particles, respectively, and is contained in the particles to the volume of the particles of a swollen state, the water content was about 95 vol(s)%. The mean particle diameter of the particles at the time of swelling was 40 micrometers.

After carrying out a sign by ^{125}I , when mouse hypodermic was medicated with the particles of 95% of this water content, the radioactivity in the administration part decreased with time. The radioactivity became zero 14 days afterward. Next, after carrying out the sign of the bFGF by ^{125}I and impregnating to gelatin particles, when in vivo administration was carried out like the above and the temporal response of radioactivity was investigated, the time dependency of survival of the radioactivity was almost the same as the case of particles. Thus, bFGF was gradual-release-ized by in vivo one with decomposition of this particle. The gradual release-ized period of bFGF from this particle was 14 days.

Working example 4 ****-izing of a basic fibroblast growth factor (bFGF)

bFGF was made to impregnate in particles by neglecting solution 10mul which contains bFGF (a grant is made from Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) of 0microg and 100microg in the freeze-drying gelatin particles (2 mg) produced in working example 3 at dropping and 25 ** for 1 hour. Then, PBS of 100microl was added and bFGF impregnation gelatin particles were distributed.

Working example 5 Enclosure of a cell and a gradual release-ized factor

It poured in carefully into the collagen scaffold which prepared cell suspension 50mul containing the cell (2×10^4 individual) prepared in working example 2 in working example 1 using the injector which attached the hypodermic needle of 22 gauges. This scaffold was neglected within 37 ** CO_2 incubator for 3 hours, and the cell was fixed in collagen sponge. Then, gradual-release-ized bFGF impregnation gelatin particle suspension 50mul which was prepared in working example 3 was added. As control, only the cell prepared the scaffold which poured in only bFGF impregnation gelatin particles.

Working example 6 Transplantation of a scaffold

SD rat was anesthetized by the 15mg [per weight]/kg FENTO barbital, and it was cut open until it reached the abdominal cavity from near the left 11 rib. It was made to expose, protecting a left kidney with gauze. After clamping the renal artery part for the prevention from bleeding, the

deficit (defect: cylindrical shape 5 mm in diameter and 5 mm in depth) was built with tweezers to the outside pars corticalis of the mesonephros cup of a left kidney, and the scaffold having contained the cell and the releasing body was embedded. The kidney outside coat of one stitch was sutured from 7.0 nylon, and disconnection was prevented. After returning a kidney, the peritoneum tunica muscularis and an envelope were sutured. Beneficial death was carried out by diethyl ether after 36 weeks, and left kidneys were collected. When adding incision to a left kidney, it took care so that it might cut in the center of a major axis of the scaffold covered with polypropylene. This organization section was produced and histological evaluation was performed. Dyeing was performed by the usual hematoxylin eosin stain.

When the specimen of the obtained embedding part was observed, the rebirth of the kidney organization was accepted only in the group embedding collagen sponge including the gelatin particles which impregnated bFGF, and an undifferentiated mesenchymal stem cell (drawing 1 A, 1B). In this experimental group, the rebirth of the glomerulus organization was checked inside a propylene mesh so that more clearly than a photograph. The vascularization and the rebirth of the renal tubule were also seen. what put only the undifferentiated mesenchymal stem cell which is control into sponge (drawing 2 A, 2B), and the thing (drawing 3 A, 3B) which put only bFGF impregnation gelatin particles into sponge --- the vascularization --- reproduction of the glomerulus was not seen although formation of the renal tubule was sometimes checked.

Although not shown here, in embedding of only sponge, invasion of a fibrous organization is also minor as compared with other groups, and the vascularization was not derived at all. This result shows that mixing with an undifferentiated mesenchymal stem cell and a cell growth factor is indispensable to a rebirth of a kidney organization.

Industrial applicability

In this invention, it uses combining an undifferentiated mesenchymal stem cell and a cell growth factor.

Therefore, the material which can reproduce the kidney by in vivo one can be obtained.

In this invention, since the cell from self-organization can be used, the problem of immunological rejection is also solved and it can be said that the availability to the Medical Science Division is very large.

[Brief Description of the Drawings]

The collagen sponge embedding group containing a drawing 1 undifferentiated mesenchymal stem cell and bFGF impregnation gelatin particles. A: The glomerulus which x100, B:x400, and an arrow reproduced is shown (after 36 weeks of embedding).

A collagen sponge embedding group including a drawing 2 undifferentiated mesenchymal stem cell. A: x100, B:x400 (after 36 weeks of embedding).

The collagen sponge embedding group containing the drawing 3 bFGF impregnation gelatin particles. A: x100, B:x400 (after 40 weeks of embedding),

[Translation done.]

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年2月20日 (20.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/013588 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/22, 35/12,
A61L 27/00, 27/22, A61P 13/12, 43/00

[JP/JP]; 〒113-8650 東京都文京区本駒込2丁目28番
8号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/07995

(22) 国際出願日: 2002年8月6日 (06.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-240491 2001年8月8日 (08.08.2001) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科研製薬
株式会社 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 田畠 泰彦 (TABATA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒611-
0024 京都府 宇治市 麴谷台3丁目8番16号 Kyoto
(JP), 小川 修 (OGAWA, Osamu) [JP/JP]; 〒606-0843 京
都府 京都市左京区 下鴨水口町42-5 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 津国 豊 (TSUKUNI, Hajime); 〒105-0001 東京
都港区虎ノ門1丁目22番12号 S V A X T S ビ
ル Tokyo (JP).

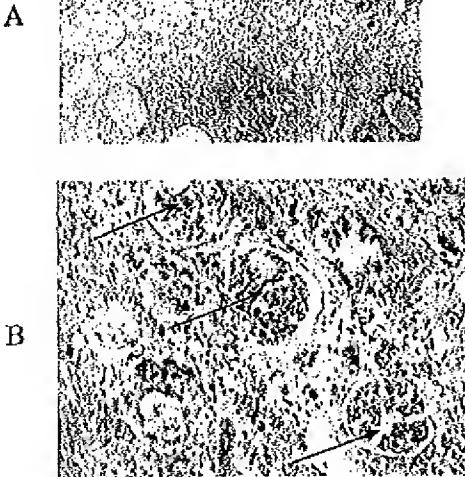
(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L, C, LK, LR, LS,
[棘葉有]

(54) Title: KIDNEY REGENERATION MATERIAL COMPRISING CELLS AND CELL GROWTH FACTOR

(54) 発明の名称: 細胞と細胞増殖因子とからなる腎臓の再生のための材料

(57) Abstract: A material for the regeneration of kidney *in vivo*
which comprises undifferentiated mesenchymal stem cells and
a cell growth factor; and a method for kidney regeneration.

(57) 要約:



本発明は、未分化間葉系幹細胞及び細胞増殖因子を含むインビポでの腎臓の再
生のための材料、及び腎臓再生方法に関する。

WO 03/013588 A1



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特

許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

明細書

細胞と細胞増殖因子とからなる腎臓の再生のための材料

技術分野

5 本発明は、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせて用いることを特徴とする腎臓のインビポでの再生のための材料に関する。

背景技術

10 人工臓器を用いた再建医療は、現在、臨床に大きく貢献しているものの、効果が一時的で、侵襲が大きく、補助できる機能が単一であるという大きな欠点がある。一方、移植医療もドナー不足に加えて、移植後の免疫抑制剤の副作用による感染症や発癌なども問題であり、理想的な治療とはいがたい。このように現在の先端医療の二本柱がそれぞれに限界に達してきている。このような状況の中で、自己の組織を再生させることによって欠損あるいは荒廃した組織や臓器を復元するという、新しい治療の試みが行われている。これが再生医学である。すなわち、細胞を利用することによって、人為的に自己の組織や臓器を再び健全なものにしようという試みである。

15 ヒトを含む哺乳動物においては、高次に分化した臓器の再生能力は消失していると考えられてきた。しかしながら、近年、これらの動物でも再生能力を有するのではないかと考えられるようになっている。つまり、哺乳動物では個体を守るために創傷治癒がありにも早く進行する結果、臓器再生の場が奪われ、本来もっている再生能力が見失われている。例えば、骨髄移植は古くから行われている治療法でありよい臨床成績をあげている。これは骨髄細胞中の血液幹細胞が増殖分化できる天与の場、骨髄組織が体内に存在しているからこそ成功していると考えられる。つまり、ヒトといえども、個体が生存していくためには、組織、臓器に幹細胞が存在しなければ生存しえないはずであり、生体内に広く存在するであろう幹細胞に対して十分な再生の場を与えることができれば、自己組織を再生させることができる可能性がある。近年、神経系や肝臓などにも幹細胞の存在することがわかつてきている。

そこで、このような考えのもとに、いろいろな組織再生の方法が研究開発されているが、現在のところ、再生のための足場、細胞増殖因子、および幹細胞の3者を組み合わせて利用する方法が最も現実的である。

再生場所における幹細胞や前駆細胞の接着・分化・形態形成の促進のためには5再生のための足場が必要である。再生場所の生体組織が再生の足場となり得る場合もあるが、再生のための足場として足場マトリックスが必要となる場合もある。生体吸収性材料はこのマトリックスとして用いられている。

しかしながら、例えば、再生場所に足場マトリックスを埋め込んでも、再生に必要な幹細胞、前駆細胞、あるいは芽細胞の数が少なかつたり、細胞を増殖分化させる生体因子の濃度が低すぎたりすれば、いかにマトリックスが優れていても、望む組織の再生は起こらない。そこで、補充するべきものとしてまず考えられるのは、細胞の増殖あるいは分化のための細胞増殖因子である。

一般に、これらの因子の生体内寿命は短く不安定であり、必要な細胞増殖因子を、単に水に溶かして必要部位に注入するだけでは、期待する組織再生効果は得られない。そこで、再生の場における細胞増殖因子の濃度を必要な期間にわたつて有効値に保たなければならない。例えば、細胞増殖因子を徐放キャリア内に含ませ、再生の場で持続的に放出させる技術である。細胞増殖因子の徐放により、細胞の増殖分化が高まり、自己組織の再生が促される。しかしながら、組織あるいは器官の種類によっては、細胞増殖因子のみでは再生が不十分である場合が多い。

腎臓は、血液濾過臓器であり、尿の形で身体の物質代謝の最終産物を排泄し、細胞外液中の水素、ナトリウム、カリウム、リンなどのイオン濃度を調節する。排泄と再吸収機構のバランスによって、水分、電解質、体液浸透圧、酸塩基平衡の調節などの機能を有する。腎臓の機能が不全になると、血圧が上昇し、尿素、クレアチニンなどの窒素代謝物が血中に貯留し、生体廃棄物の血中濃度が有害な濃度にまで増加する。このような病理を解消するためには、不全の腎臓の機能を置き換える処置が必要になる。

血液透析は、腎臓機能不全状態にある血液を清浄化、そして濾過する処置である。当該処置によって、有害廃棄物等の濃度が減少する。しかし、この処置は、

週に3回、1回2～4時間もかかるうえに、副作用及び合併症の危険があるという問題点がある。

腎移植は、ドナーからの健康な腎臓を腎不全に苦しむ個体内に植え付ける処置である。しかし、一生涯に渡る免疫抑制剤の投与を必要とし、その結果生ずる感染性、癌化などの副作用が問題となっている。また、移植を必要とする全ての個体に十分な量のドナーがないという問題点もある。

腎臓それ自体の移植ではなく、腎臓細胞の移植も報告されている (Pediatrics, 1996, 98S, 615)。それによると、C57ブラックマウスの腎臓細胞を培養し、ポリカーボネート製チューブに封入後、無胸腺マウスの皮下に移植したところ、8週間後までの観察において、血管新生、糸球体及び尿細管様構造が認められた。尿細管様構造部位にはアルカリホスファターゼ及びフィプロネクチンが認められ、分泌された黄色の液体から尿酸が検出された。

また、別の報告によると、ニュージーランド白ウサギの腎臓細胞を遠位尿細管、糸球体、近位尿細管に分画し、それぞれをポリ乳酸一ポリグリコール酸シート上で培養し、無胸腺マウスの皮下に移植したところ、ネフロンの形成が認められた (J. Urol, 1995, 153(suppl.), 4)。

WO 98/09582は、上記技術を応用した人工腎臓を開示する。しかし、この人工腎臓は、ハイブリッド型人工腎臓、すなわち腎臓を摘出し、その細胞を培養した後に臓器様に再構築したものである。このような分化細胞は、その寿命に限りがあり、また腎臓細胞としての機能維持が困難であることから、人工腎臓の耐久性・信頼性に問題がある。また、異種動物からのような非自己の細胞を用いる場合においては、常に、免疫拒絶の問題がつきまと。

組織器官の再生をインビオで行うためには、その組織あるいは器官を構成している細胞が必要であることは疑いない。しかしながら、単に細胞を再生させたい部位に注入するだけで、その場所に組織や器官を再生させることはきわめて難しい。その理由は加えられた細胞がその部位で増殖、分化することがほとんど期待できないからである。生体内で細胞の増殖および分化を積極的に促進させるためには細胞増殖因子の存在が不可欠である。すでに、多くのインビトロ実験によつて、未分化間葉系幹細胞、前駆細胞、あるいは芽細胞が適当な細胞増殖因子の存

在下でその数を増やし、分化していくことが証明されている。しかし、インビトロとインビボでは細胞の環境が全く異なっており、インビトロでの結果をインビボにおいて再現、予測するのは困難である場合が多い。

5 本発明者らはインビボにおける細胞の増殖分化に関する上記の問題点を解決するため銳意検討した結果、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせて用いることによって、インビボにおける腎臓の再生が極めて有利となることを見出し、本発明を完成した。

発明の開示

10 したがって、本発明は、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせて用いることによって、腎臓をインビボで再生させるための材料を供給する。
また、本発明は、上記材料を用いることを含む、腎臓の再生方法にも関する。

図面の簡単な説明

15 図 1

未分化間葉系幹細胞と b FGF 含浸ゼラチン粒子とを含むコラーゲンスポンジ埋入群。A : $\times 100$ 、B : $\times 400$ 、矢印が再生した糸球体を示す（埋入 36 週後）。

図 2

20 未分化間葉系幹細胞を含むコラーゲンスポンジ埋入群。A : $\times 100$ 、B : $\times 400$ （埋入 36 週後）。

図 3

b FGF 含浸ゼラチン粒子を含むコラーゲンスポンジ埋入群。A : $\times 100$ 、B : $\times 400$ （埋入 40 週後）。

25

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の技術的構成を説明する。

本発明で使用される細胞は、未分化間葉系幹細胞である。この細胞は、動物、ヒトから採取することにより、又はその採取細胞を培養系にて数を増やしたりす

ることができる。

本発明に用いる未分化間葉系幹細胞、その細胞増殖因子との混合、およびそれらの組織工学材料を用いた腎組織の再生は以下の方法によって行うことができる。

細胞単離法に若干の修飾点を加えることも可能であるが、それらは大きく細胞の分化性質に寄与するところはない。未分化間葉系幹細胞の採取法は常法によつて行うことができる。例えば、大腿骨、頸骨等の骨髄から骨髄液を採取し、これをピペッティング等によって細胞を分散させ、 α -MEM等の適切な培地又は塩類溶液に懸濁し、骨髄細胞懸濁液を調製する。この細胞を37°C、5%炭酸ガスの条件下、インキュベーターにて、例えば、7~10日間培養し、その後接着細胞を、例えば、0.05%トリプシンを用いて剥離し、回収する。

得られた未分化間葉系幹細胞を37°C、5%炭酸ガスの条件下、インキュベーターにて培養し、細胞を増殖・継代することもできる。この細胞を培養液に分散させ、その中に適当な濃度の細胞増殖因子を混合する。得られた複合体を、例えば、SDラットの腎臓欠損に埋入する。36週間後、埋入部位に腎組織の再生が見られる。

採取する細胞は、未分化間葉系幹細胞であれば、採取する動物の種類、年齢、およびその部位に関係なく、いずれの組織も本発明に用いることができる。一般に、免疫拒絶は細胞成分に対する生体反応である。この免疫拒絶を回避する方法として、例えば、自己の組織から採取された未分化間葉系幹細胞を用いる方法がある。これによれば免疫反応の問題は解決することができると考えられる。すなわち、本発明においては、自己の細胞成分を利用することによって、自己の腎組織を再生することもできる。

本発明に用いる細胞増殖因子としては、特に限定されるものではないが、未分化間葉系幹細胞の数を増加させる作用をもつものが好ましい。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子 (IGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア誘導神経栄養因子 (GDNF)、神経栄養因子 (NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子 (BMP)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) などが挙げられる。これらのうち、本発明では、特に、bFGF が望ましい。その濃度は、細胞数

10⁵～10⁸個当たり 0.0001～10 μg、好ましくは 0.001～1 μg である。

本発明に使用されるこれらの細胞増殖因子は、好ましくは適切な徐放用担体に含有させた状態で細胞と混合して用いる。適切な徐放用担体に含有させた状態で使用する場合には、その徐放期間は約 1 から 3 週間の範囲がよい。

細胞増殖因子の徐放用担体としては、生体内で分解吸収されていく性質をもつものが好ましい。例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグルコール酸との共重合体、ポリ-ε-カプロラクトン、ε-カプロラクトンと乳酸あるいはグリコール酸との共重合体、ポリクエン酸、ポリリンゴ酸、ポリ-α-シアノアクリレート、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸、ポリトリメチレンオキサレート、ポリテトラメチレンオキサレート、ポリオルソエステル、ポリオルソカーボネート、ポリエチレンカーボネート、ポリプロピレンカーボネート、ポリ-γ-ベンジル-L-グルタメート、ポリ-γ-メチル-L-グルタメート、ポリ-L-アラニンなどの合成高分子、デンプン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、ペクチン酸およびその誘導体などの多糖、あるいはゼラチン、コラーゲン（コラーゲンのタイプおよびその抽出法はいずれでもよい）、アルブミン、フィブリリンなどのタンパク質などが挙げられる。これらの材料から細胞増殖因子の徐放用担体を作製できるが、その形態としては、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびペースト状などがあるが、これらに限定されるものではない。例えば、その中で基底膜成分との均一な混合を目的とする場合には、粒子状の担体が好ましい。また、粒子の直径は 10～500 μm、好ましくは 20～100 μm である。

徐放性の調節は、徐放用担体の分解性を調節することにより行なうことができる。分解性の調節は、例えば、担体作製時における架橋度を変えることにより行なうことができる。徐放期間を 1～3 週間とするには、例えば、担体作製時の架橋剤濃度あるいは反応時間を調節し、含水率を 98～94 % として、1～3 週間で分解吸収される徐放用担体を作製すればよい。

細胞と細胞増殖因子とからなる組織工学材料の作製条件は、特に限定されるものではないが、例えば、両者を単に混合するだけでもよく、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、あるいはコラーゲン溶液などの液体とともに混合して

もよい。用いる細胞の数として10万～500万個が望ましい。さらに、細胞と細胞増殖因子との混合物を生体吸収性材料からなるスポンジ、メッシュ、不織布状成形物などの足場材料内へ注入、あるいはそれらの足場材料と混ぜ合わせた状態で用いることもできる。

5 この際に用いる足場材料としては生体吸収性であることが必須であると考えられ、非吸収性の場合には組織の再生を物理的に邪魔をするので好ましくない。足場材料の分解吸収性は、組織の再生の邪魔にならないように適当なものを選択して用いる必要がある。足場材料が合成高分子の場合にはその分子量、化学組成により、天然高分子の場合には架橋の程度によりそれらの吸収性はコントロールできる。これらのことについては、公知の方法を用いることができる。

10 本発明にて用いられる細胞、細胞増殖因子の注入、混合のために用いられる足場材料としては、生体内で分解吸収されていく性質をもつことが必須であり、例えば、好ましくは上述の細胞増殖因子の徐放用担体に用いられる材料を利用できる。足場材料と徐放性担体は同一の材料を用いてもよいし、異なるものを用いてもよい。その形態としては、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびペースト状などがあるが、これらに限定されるものではない。

15 本発明の細胞と細胞増殖因子との混合物あるいはその足場材料との混合複合物は、皮膚を切開して埋入あるいは注射により注入することで体内へ投入できる。

20 実施例

以下、実施例をあげて本発明について説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1 足場の調製

25 140°Cで2時間の熱処理の後、0.2wt%のグルタルアルデヒド水溶液中で化学架橋を行った後、グリシン水溶液中にて未反応のアルデヒド基をブロックした。その後水洗いを行い凍結乾燥することによって得たコラーゲンスポンジを直径約5mm、厚さ3mmの円筒形に打ち抜いた。滅菌したポアサイズ200μmのポリプロピレンのメッシュでコラーゲンスポンジを巻き、その形状を維持するため

に7.0ナイロン糸で更にメッシュを固定した。これを腎臓に作製した円柱状欠損部へ埋入した。メッシュを入れた理由は、組織内において埋入コラーゲンスポンジ部位と腎組織部位とを隔離し、再生組織が欠損部に新生したものか、腎組織由来の組織なのかを明瞭化するためである。

5

実施例2 未分化間葉系幹細胞の単離及び精製

6週齢の雌のSDラット（株式会社清水実験動物）の大腿骨及び脛骨を摘出し、清潔操作で骨髄を採取し、初期培地（ α MEM、GIBCO BRL）10.2wt%、炭酸水素ナトリウム（ナカライテスク）26.2mM、ペニシリン（500U/1）
10
アストレプトマイシン（500 μ g/1）合剤（SIGMA）、仔ウシ血清15%で培養した。7～10日後、接着した細胞を0.05%トリプシン/EDTA溶液で回収し、同じ培地を用いて継代した。

実施例3 ゼラチン粒子の調製

15 1000ml容の丸底フラスコにオリーブ油375mlを加え、固定した攪拌用モーター（新東科学社製、スリーワンモーター）にテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した。オリーブ油を30°C、420rpmにて攪拌しながら等電点4.9のアルカリ処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）の水溶液（10wt%、10ml）を滴下し、W/O型エマルジョンを調製した。10分間の攪拌後、フラスコを10～20°Cに冷却し、さらに、30分間攪拌した。エマルジョンへ100mlのアセトンを加え、さらに1時間攪拌した後、遠心分離（5000rpm、4°C、5分間）によりゼラチン粒子を回収した。アセトンさらに2-プロパノールを用いて粒子を遠心洗浄することによって、未架橋のゼラチン粒子を得た。得られた未架橋ゼラチン粒子（500mg）を0.01wt%濃度のグルタルアルデヒドを含む、0.1wt%Tween 80の水溶液（100ml）に懸濁させ、4°C、15時間緩やかに攪拌することによってゼラチンの架橋反応を行った。その後、粒子を0.1wt%Tween 80の水溶液、2-プロパノール、蒸留水で2回ずつ洗浄した後、凍結乾燥した。2-プロパノールからの風乾時あるいはPBS中、37°Cでの平衡膨潤時における粒子の直径を、それぞれ100個粒子

について顕微鏡にて測定し、膨潤状態の粒子の体積に対する粒子に含まれる水の体積の比として含水率を算出したところ、その含水率は約 9.5 vol% であった。また、膨潤時における粒子の平均粒径は 4.0 μm であった。

5 ^{125}I により標識した後、この含水率 9.5 % の粒子をマウス皮下に投与したところ、投与部位での放射活性は時間とともに減少した。その放射活性は 14 日後にゼロとなった。次に、bFGF を ^{125}I により標識し、ゼラチン粒子に含浸した後、上記と同様にインビボ投与して、放射活性の時間的変化を調べたところ、その放射活性の残存の時間依存性は粒子の場合とほぼ同じであった。このように、この粒子の分解とともに bFGF はインビボで徐放化された。この粒子からの b
10 FGF の徐放化期間は 14 日であった。

実施例 4 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の除放化

実施例 3 で作製した凍結乾燥ゼラチン粒子 (2 mg) に 0 μg および 100 μg 15 の bFGF (科研製薬株式会社より供与) を含む水溶液 10 μl を滴下、25°C で 1 時間放置することによって bFGF を粒子内に含浸させた。その後、100 μl の PBS を加え bFGF 含浸ゼラチン粒子を分散させた。

実施例 5 細胞及び徐放化因子の封入

実施例 2 で調製した細胞 (2×10^4 個) を含む細胞懸濁液 50 μl を 20 22 ゲージの注射針をつけた注射器を用いて実施例 1 で調製したコラーゲン足場内に注意深く注入した。この足場を 37°C の CO₂ インキュベーター内で 3 時間放置し、細胞をコラーゲンスポンジ内に定着させた。その後、実施例 3 で調製した徐放化した bFGF 含浸ゼラチン粒子懸濁液 50 μl を加えた。コントロールとして、細胞のみあるいは bFGF 含浸ゼラチン粒子のみを注入した足場を調製 25 した。

実施例 6 足場の移植

SD ラットを体重あたり 1.5 mg/kg のフェントバルビタールで麻酔し、左 11 肋骨付近より腹腔に達するまで切開した。左腎をガーゼで保護しながら露出

させた。出血防止のため腎動脈部をクランプした上で、左腎の中腎盃の外側皮質部にピンセットで欠損 (defect: 直径 5 mm、深さ 5 mm の円柱状) をつくり、細胞及び徐放体を含んだ足場を埋め込んだ。腎外側皮膜を 7.0 ナイロンで 1 針縫合して脱離を防いだ。腎を元に戻した後、腹膜筋層、外皮を縫合した。3 6 週間後ジエチルエーテルで犠死させ、左腎を回収した。左腎に切開を加えるときは、
5 ポリプロピレンで被覆された足場の長径中央で切断するように留意した。この組織切片を作製し、組織学的評価を行った。染色は通常のヘマトキシリソジン染色で行った。

得られた埋入部位の標本を観察したところ、bFGF を含浸したゼラチン粒子
10 と未分化間葉系幹細胞とを含むコラーゲンスponジを埋入した群においてのみ、腎組織の再生が認められた (図 1A、1B)。写真よりあきらかに、この実験群においては、プロピレンメッシュの内側に、糸球体組織の再生が確認された。血管新生ならびに尿細管の新生も見られた。コントロールである未分化間葉系幹細胞のみをスponジに入れたもの (図 2A、2B)、bFGF 含浸ゼラチン粒子のみをスponジに入れたもの (図 3A、3B) では血管新生、時として尿細管の形成は確認されたが、糸球体の再生は見られなかった。ここには示していないが、スponジのみの埋入では、纖維性組織の侵入も他のグループと比較して軽微であり、血管新生などは全く誘導されていなかった。この結果は、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子との混合が腎組織の再生に不可欠であることを示している。
15
20

産業上の利用可能性

本発明によれば、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせて用いることにより、腎臓をインビボで再生させることができる材料を得ることができる。
25 また、本発明では、自己組織からの細胞を用いることができることから、免疫拒絶の問題も解消され、その医療への利用性は非常に大きいといえる。

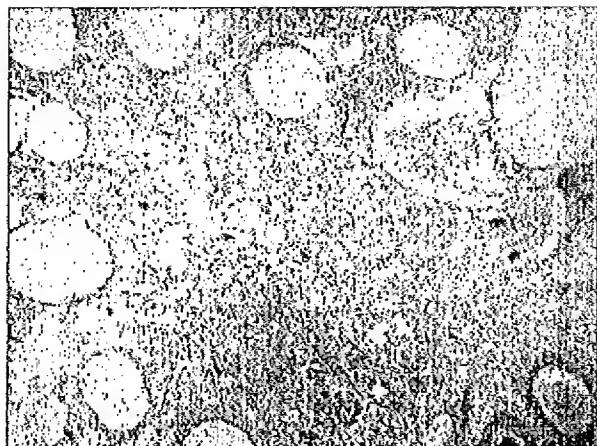
請 求 の 範 囲

1. 未分化間葉系幹細胞及び細胞増殖因子を含むインビボでの腎臓の再生のための材料。
- 5 2. 細胞増殖因子が徐放性であることを特徴とする、請求の範囲第1項記載の材料。
3. 細胞増殖因子が徐放性担体により徐放化されていることを特徴とする、請求の範囲第2項記載の材料。
4. さらに、足場材料を含む、請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項記載の材料。
- 10 5. 細胞増殖因子が bFGF である、請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項記載の材料。
6. 細胞増殖因子が bFGF であり、徐放性担体が架橋ゼラチンである、請求の範囲第3項記載の材料。
7. 細胞増殖因子が bFGF であり、徐放性担体が架橋ゼラチンであり、足場材料がコラーゲンである、請求の範囲第4項記載の材料。
- 15 8. 請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の材料を用いることを含む、腎臓の再生方法。

1 / 3

図 1

A

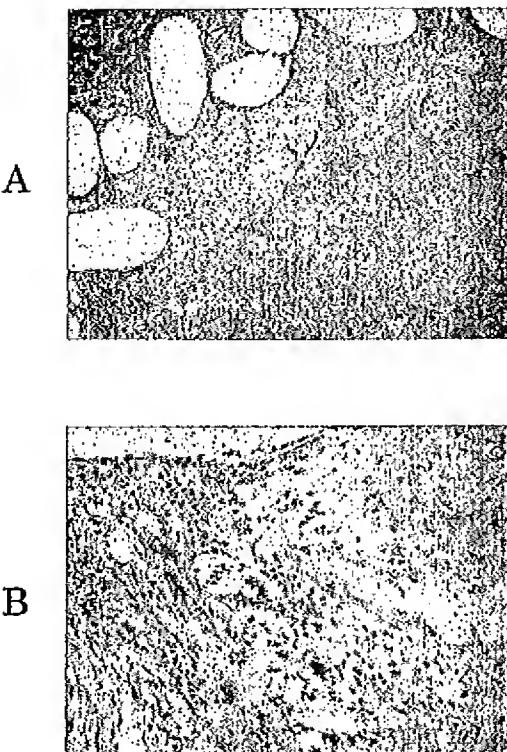


B



2 / 3

図 2



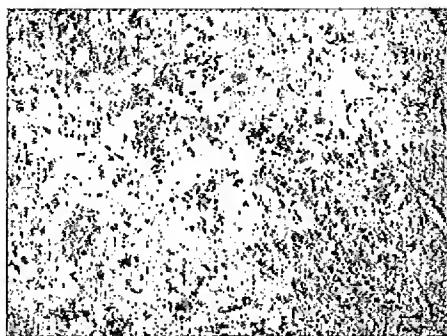
3 / 3

図 3

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07995

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ A61K38/22, 35/12, A61L27/00, 27/22, A61P13/12, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ A61K38/00-38/58, A61L15/00-33/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN), WPI/L(QUESTEL), JOIS(JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TABATA, Y. et al., "Bone formation at a rabbit skull defect by autologous bone marrow cells combined with gelatin microspheres containing TGF- β 1", J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2000, Vol.11, No.8, pages 891 to 901 Particularly, refer to abstract, No.892, lines 2 to 4	1-7
Y	IMASAWA, T. et al., The potential of bone marrow -derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells, J. Am. Soc. Nephrol., 2001 July, Vol.12, No.7, pages 1401 to 1409, particularly, refer to abstract	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 01 October, 2002 (01.10.02)	Date of mailing of the international search report 15 October, 2002 (15.10.02)
------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07995

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/11664 A1 (Genetics Institute, Inc.), 11 March, 1999 (11.03.99), Page 2, lines 3 to 4; page 6, lines 25 to 28 & AU 9893062 A & EP 1007559 A1 & JP 2001-514026 A & US 2002/0102728 A1	1-7
A	WO 98/09582 A1 (Children's Medical Center Corp.), 12 March, 1998 (12.03.98), Full text & AU 9743318 A & EP 929271 A1 & JP 2001-506871 A	1-7
A	JP 08-198763 A (Yugen Kaisha Naisemu), 06 August, 1996 (06.08.96), Par. No. [0022] (Family: none)	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07995

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 A61K38/22, 35/12, A61L27/00, 27/22,
A61P13/12, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 A61K38/00-38/58, A61L15/00-33/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
EMBASE (STN), WPI/L (QUESTEL), JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TABATA, Y. et al, Bone formation at a rabbit skull defect by autologous bone marrow cells combined with gelatin microspheres containing TGF- β 1, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2000, Vol. 11, No. 8, p. 891-901, 特にAbstract, 第892行-第4行参照	1-7
Y	IMASAWA, T. et al, The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells, J. Am. Soc. Nephrol., 2001 July, Vol. 12, No. 7, p. 1401-1409, 特にAbstract参照	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 10. 02

国際調査報告の発送日

15.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

岡崎 美穂



4C 3039

電話番号 03-3681-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	WO 99/11664 A1 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 1999.03.11, 第2頁第3行～第4行、第6頁第25行～第28行参照 & AU 9893062 A & EP 1007559 A1 & JP2001-514026 A & US 2002/0102728 A1	1-7
A	WO 98/09582 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 1998.03.12, 全文 & AU 9743318 A & EP 929271 A1 & JP 2001-506871 A	1-7
A	JP 08-198763 A (有限会社ナイセム) 1996.08.06, 【0022】段落参照 (ファミリーなし)	1-7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲8は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。